



Efeitos da suplementação enzimática de dietas à base de cevada nas performances de frangos de carne

Paula Cristina Antónia dos Santos

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Zootécnica – Produção Animal**

Orientador: Professora Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo

Júri:

Presidente: Doutora Luísa Almeida Lima Falcão e Cunha, Professora Associada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: - Doutor José Pedro da Costa Cardoso Lemos, Professor Associado da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa;

- Doutora Maria Madalena dos Santos Lordelo, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2008

Agradecimentos

Começo por agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Madalena Lordelo, pela sua disponibilidade e paciência em me ensinar e orientar ao longo de todo o trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Fontes, pela sua disponibilidade em me ensinar.

Às Doutoras Patrícia Ponte e Catarina Guerreiro pela sua ajuda no trabalho prático e pela disponibilidade que tiveram em tirar dúvidas sempre que foi necessário.

Ao meu colega Miguel que ajudou a realizar o trabalho de laboratório.

Às funcionárias do laboratório “Professor Pais de Azevedo”, Sr.^a Lúcia Fortes e Sr.^a Cesaltina Pires, e à funcionária do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária, Sr.^a Mena, pela disponibilidade que tiveram para me ensinarem e ajudarem a realizar o trabalho de laboratório.

Aos meus Pais, pois sem eles nunca teria chegado onde cheguei.

Aos meus irmãos Vítor e Pedro, pelo seu apoio e especialmente ao meu irmão Vítor por me ter emprestado o seu computador.

A todos os meus colegas que ao longo do curso me ajudaram.

“At last but not the least” ao Bruno Coutinho, uma pessoa muito especial e importante da minha vida, pelo seu apoio e paciência incondicional.

Resumo

O uso de enzimas exógenas na alimentação dos frangos faz com que a cevada que possui um factor anti-nutricional, possa ser utilizada. Esse factor anti-nutricional é o β -glucano, um polissacárido não amiláceo solúvel.

Neste trabalho, com o objectivo de estudar a suplementação enzimática em dietas à base de cevada, foram distribuídos cinco tratamentos: C- que era o tratamento de controlo pois não tinha suplementação enzimática, 33 H1 e 100 H1 que tinham a enzima modular GH26-GH5 (β -glucanase – Celulase) e 33 H2 e 100 H2 que tinham a enzima modular GH26-GH5-CBM11 (β -glucanase – Celulase – carbohydrate-binding module). Para avaliar os efeitos das enzimas utilizadas analisaram-se as performances dos animais e a viscosidade *in vitro* e *in vivo*. Também se analisou a actividade enzimática e a estabilidade das enzimas utilizadas nos vários componentes do aparelho digestivo.

Os resultados não demonstraram melhorias nas performances das aves alimentadas com as dietas suplementadas pelas enzimas quando comparadas com as performances das aves alimentadas com a dieta sem suplementação enzimática.

É sugerido que o efeito das enzimas não se evidenciou devido à concentração dos β -glucanos na cevada não ser elevada e que a concentração enzimática talvez seja demasiada alta para que o efeito do CBM seja verificado.

Palavras-chave: Frangos; Cevada; β -glucano; Enzimas; CBM

Abstract

The utilisation of exogenous enzymes in broilers diets makes it possible for barley that has an anti-nutritional factor to be used. This anti-nutritional factor is the β -glucan, a water-soluble non-starch polysaccharide.

With the purpose of studying the enzymatic supplementation five barley based diets treatments were assigned, C- the control treatment without enzyme supplementation, 33 H1 and 100 H1 treatments that had the modular enzyme GH26-GH5 (β -glucanase – Cellulase) and 33 H2 and 100 H2 that had de modular enzyme GH26-GH5-CBM11 (β -glucanase – Cellulase – carbohydrate-binding module). To evaluate the effects of the enzymes we looked at the performances of the animals and the viscosity *in vitro* and *in vivo* were analyzed. Also the enzymatic activity and the enzymes stability were analyzed in the various components of the digestive tract.

The results didn't showed improvements in the birds performances fed on diets with enzyme supplementation when compared with birds fed on diets not supplemented with exogenous enzymes.

It is suggested that the enzymes effects wasn't evident because the concentration of the β -glucans in the barley was too low and the enzymatic concentration was too high and so the effect of the CBM wasn't verified.

Key-words: Broilers; Barley; β -glucan; Enzymes; CBM.

Abstract

The use of exogenous enzymes in broiler diets is very common in the present days, since their beneficial value is widely recognized.

Some cereal grains like barley have anti-nutritional factors that limit their utilization in the broilers diets. In the case of barley the anti-nutritional factor is the water-soluble non-starch polysaccharide β -glucan. The β -glucan increases the viscosity of the *digesta* and because of that the performances of the birds are affected negatively. The increase of the viscosity of the *digesta* doesn't allow the digestion and absorption of nutrients to occur totally and so the performances of the birds are less than expected. The viscosity also increases the components of the gastrointestinal tract and these reduce the income of the broilers carcass. To overcome this problem of the *digesta* viscosity it may be use appropriated exogenous enzymes to supplement broilers diets.

Cellulases generally contain non-catalytic carbohydrates-binding modules (CBMs) that mediate a prolonged and intimate contact of the enzyme with the target substrate eliciting efficient hydrolysis of the target polysaccharides.

In this work to study the enzymatic supplementation of barley base diets in broilers 160 broilers chicks were distributed throughout 40 cages staying four in each one. Five treatments C-, 33 H1, 100 H1, 33 H2 e 100 H2 were distributed throughout the cages. The C- treatment was the control treatment since he didn't have enzymatic supplementation, the 33 H1 and 100 H1 treatments had the modular enzyme GH26-GH5 (β -glucanase – Cellulase) but whit different concentrations (700 U/kg e 2000 U/kg respectively) and the 33 H2 and 100 H2 had de modular enzyme GH26-GH5-CBM11 (β -glucanase – Cellulase – carbohydrate-binding module) and also whit different concentrations (700 U/kg e 2000 U/kg respectively). To evaluate the effects of these enzymes the performances of the broilers throughout the trial were analyzed. The analysis of the performances consisted in the broiler feed intake, weight and feed:gain ratio. The viscosities *in vitro* and *in vivo*, the weight of the crop, gizzard and liver, and the length of the duodenum, jejunum, ileum and caecum of each treatment were analyzed also to evaluate the effects of the enzymes in broilers. It was also verified the activity and stability of the exogenous enzymes throughout the gastrointestinal tract. The analyses to verify the activity of the exogenous enzymes were made in agar plaques that had β -glucans of barley and in zymograms that also had β -glucans of barley. The zymograms analysis allowed also to verify the stability of the exogenous enzymes.

The birds fed on the diet with enzyme supplementation didn't showed improvement in their performances when compared with the birds fed on diets not supplemented with exogenous enzymes. This may be because the concentration of barley β -glucans was low.

It is suggested that the enzymatic concentration is too high and so the effect of the CBM isn't verify and also because of the CBM ability to link to cellulose.

Índice Geral

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Abstract	IV
Índice de quadros.....	VIII
Índice de figuras.....	VIII
Lista de abreviaturas.....	IX
Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica.....	3
1 - Frangos de carne	3
1.1 - Denominação, origem e domesticação.....	3
1.2 - Evolução da indústria de aves.....	3
1.3 - Evolução das raças de galinhas.....	4
1.4 - Sistema digestivo dos frangos.....	5
2 - Cevada (<i>Hordeum Sativum</i>)	7
2.1- Estrutura do grão da Cevada	7
2.2 - Composição e valor nutritivo	8
2.3 - Composição da fibra	8
2.4 - O uso da cevada na alimentação dos frangos.....	8
3 - Enzimas	10
3.1 - O que são e qual é a sua função.....	10
3.2 - Enzimas digestivas.....	10
3.3 - Enzimas exógenas em alimentação animal.....	11
3.3.1 - Carboidrases.....	12
4 - Carbohydrate-Binding Module (CBM).....	14
5 - Objectivo	14
Capítulo 3 – Materiais e Métodos	15
1 - Alimento	15
2 - Animais e Instalações	16
3 - Tratamentos.....	17
4 - Análises laboratoriais	18
5 - Análise Estatística	19
Capítulo 4 – Resultados.....	20
1- Performances dos Frangos	20

2 - Viscosidades.....	22
3 - Actividade Enzimática	23
Capítulo 5 – Discussão	27
Capítulo 6 – Conclusão.....	31
Capítulo 7 – Referências Bibliográficas.....	32
Anexo 1	38

Índice de Quadros

Quadro 1 – Efeito da adição da β -glucanase em dietas com cevada sem casca na performance dos frangos.....	13
Quadro 2 – Libertação de proteína de células isoladas da aleurona por preparações de β -glucanase comercial e celulase.....	13
Quadro 3 – Composição e análise química do alimento concentrado base	15
Quadro 4 – Média de alimento (g) ingerido por animal em cada tratamento	20
Quadro 5 – Média do alimento total (g) ingerido por animal em cada tratamento	20
Quadro 6 – Média de peso (g) por animal em cada tratamento	20
Quadro 7 – Média de IC por tratamento	21
Quadro 8 – Média de IC total por tratamento.....	21
Quadro 9 – Média do peso relativo (g/kg P.V.) dos órgãos em análise.....	21
Quadro 10 – Média de comprimento relativo (cm/kg P.V.) dos órgãos em análise	22
Quadro 11 – Classificação da actividade enzimática por tratamento e fracção do tubo digestivo.....	25
Quadro 12 – Performances esperadas do Ross 308 (Machos)	38

Índice de Figuras

Figura 1 – Ilustração da diversidade fenotípica de diferentes raças de galinhas domésticas.	4
Figura 2 – Esquema do sistema digestivo das aves	7
Figura 3 – Espiga da cevada e um corte longitudinal de um grão de cevada.....	7
Figura 4 – Péptidos e disacáridos são quebrados por hidrólise, sob acção catalítica enzimática.....	11
Figura 5 – Representação esquemática das enzimas modulares H1 e H2	17
Figura 6 – Gráfico da viscosidade (cpo) do alimento de cada tratamento.....	22
Figura 7 – Gráfico da média de viscosidade (cpo) do <i>digesta</i> do duodeno+jejuno e íleo	23
Figura 8 – Detecção da actividade enzimática no <i>digesta</i> dos vários órgãos analisados dos diferentes tratamentos.....	24
Figura 9 – Zimogramas de amostras de conteúdos dos órgãos do tubo digestivo, pertencente a um animal de cada tratamento.....	26

Lista de Abreviaturas

CBM – Cabohydrate-binding module

cpo - Centipoise

g – Gramas

IC – Índice de Conversão

PNAs – Polissacáridos não amiláceos solúveis

Rpm – Rotações por minuto

U – Unidade de actividade enzimática

Capítulo 1 – Introdução

A alimentação nas aves representa 50 a 70 % do seu custo de produção (Parkhurst e Mountney, 1988).

Os grãos de cereais constituem a maior percentagem na dieta das aves e são a sua maior fonte de energia e em certas fases do crescimento até 90 % da sua dieta pode consistir em cereais e ou produtos à base de cereais (McDonald *et al.*, 2002). Um dos cereais mais utilizados na alimentação das aves é o milho. O milho é considerado ideal porque o seu conteúdo em factores anti nutricionais (polissacáridos não amiláceos solúveis) é baixo. A utilização dos outros cereais é menor porque possuem um valor mais elevado de PNAs. Mas em determinadas zonas a disponibilidade destes cereais poderá ser maior do que o milho.

A cevada constitui um excelente cereal para a produção de aves (Rotter *et al.*, 1989). O conteúdo proteico da cevada é maior que o do milho e o balanço de aminoácidos é melhor que o do trigo (Chesson, 1991). Mas porque a cevada contém um factor anti-nutricional, que é o β -glucano (polissacárido não amiláceo solúvel (PNAs)), quando este cereal é adicionado na alimentação das aves impede a digestão e a absorção parcial de nutrientes, por aumentar a viscosidade no aparelho digestivo. Nas aves, a natureza viscosa do *digesta* resulta numa baixa performance (Annison e Choct, 1991).

Uma suplementação enzimática (β -glucanase) em dietas à base de cevada melhora a performance (melhoria da taxa do peso vivo e do índice de conversão), reduz os problemas nas camas e aumenta a energia metabolizável da dieta. Ao hidrolisar os β -glucanos, as enzimas reduzem a viscosidade do *digesta* permitindo assim um maior envolvimento das enzimas endógenas com o *digesta*, melhorando a digestão e a absorção dos nutrientes (McDonald *et al.*, 2002). A divisão enzimática é a maneira mais prática e eficaz de quebrar os PNAs no aparelho digestivo do animal (Choct, 2006).

Ao utilizarmos o Carbohydrate-binding module (CBM) com as enzimas modulares vamos aumentar a concentração enzimática na superfície dos substratos (polissacáridos solúveis ou insolúveis, tal como a celulose) e assim potenciar a actividade nos domínios catalíticos associados (Fernandes *et al.*, 1999).

O uso de enzimas nas dietas das aves é actualmente muito comum em muitos países onde os cereais predominantes são a cevada ou o trigo. Muitos fabricantes de rações aprenderam a confiar nas enzimas alimentares para ajudar a atingir uma consistência na performance, em conjunção com a diminuição dos limites dos níveis de inclusão de alguns ingredientes, para reduzir os custos de formulação (Bedford e Morgan, 1996).

A suplementação enzimática pode ser uma das soluções mais económicas nos países onde existe uma elevada produção de cevada, podendo assim desafiar o corrente monopólio do trigo e do milho (Chesson, 1991).

Capítulo 2 – Revisão Bibliográfica

1- Frangos de Carne

1.1 – Denominação, Origem e Domesticação

As galinhas e as suas famílias aparentadas mais chegadas (por exemplo as galinhas da Guiné, os perus, os pavões e as codornizes) formam as aves galiformes ou galináceas, que são terrestres, com aparência de galinha, com um corpo pesado, voos de duração curta, alimentando-se de sementes e insectos e com ninhos colocados no chão. Os jovens são precoces (os jovens são incubados pelas mães e são capazes de se alimentarem e andarem por eles próprios após a eclosão).

As galinhas domésticas pertencem à família *Phasiannidae*, ao género *Gallus* e à espécie *Gallus domesticus* e o seu antepassado é provavelmente o *red jungle fowl* (*Gallus gallus*) que tem origem no Sudeste da Ásia. Parece que provavelmente as pessoas domesticaram as galinhas há mais de 4000 anos atrás, depois de séculos a caçar o *red jungle fowl* como alimento (Parkhurst e Mountney, 1988).

Hoje em dia as galinhas podem ser encontradas na maior parte do mundo, independentemente do clima.

1.2 – Evolução da Indústria das aves

A indústria das aves evoluiu de uma actividade caseira para uma actividade corporativa tecnicamente elevada e capitalizável à medida que a biologia progrediu de uma ciência descritiva para analítica. Esta transformação foi possível porque se utilizou descobertas básicas de biologia para resolver barreiras tecnológicas à produção intensiva de aves. Como exemplo, a formulação de dietas para aves com aminoácidos e vitaminas sintéticas que optimizaram o crescimento e a eficiência alimentar e assim reduziram os custos de produção. Também as vacinas disponíveis permitiram que um grande número de aves fossem alojadas juntas e assim aumentarem a eficiência na produção (Etches, 1998).

O crescimento fenomenal da indústria das aves durante o século vinte tem sido facilitado pelo desenvolvimento de tecnologia que forneceu alojamentos adequados, controlo da dispersão de doenças, dietas apropriadas e genótipos seleccionados que têm uma performance eficiente. Devido a esse crescimento na indústria das aves no final do século vinte as galinhas eram uma das mais importantes fontes de proteína de elevada qualidade na alimentação humana (Etches, 1998).

De 1950 a 1990 a taxa de crescimento de frangos de carne aumentou substancialmente. Em 1950, eram preciso entre 12 a 14 semanas para produzir um frango de 2 kg. Entre 1950 e meados 1990, aproximadamente um dia por ano foi eliminado do período de crescimento para um frango de carne de 2 kg (Etches, 1998). Devido a esse aumento da taxa de crescimento as empresas de aves quando comparadas hoje em dia com as de outras espécies de animais domésticos são mais facilmente estabelecidas e mais económicas (Parkhurst e Mountney, 1988).

O potencial genético a atingir em qualquer espécie depende de:

- O genótipo ser capaz de atingir a performance esperada.
- O ambiente ser gerido para que as necessidades das aves sejam satisfeitas (ex. temperatura, qualidade do ar, etc.).
- O alimento forneça os nutrientes suficientes e nas proporções correctas.
- O estado de imunidade seja apropriado e as doenças controladas.

Todos estes pontos são independentes. Se algum destes elementos estiver sub-óptimo, a performance dos frangos de carne irá sofrer (Ross, 2008).

O sucesso na indústria das aves depende de uma série de interacções complexas que inclui, ciência, tecnologia, comércio e negócio.

1.3 – Evolução das raças de galinhas

Durante os dois séculos que passaram mais de 300 raças puras e variedades de galinhas foram desenvolvidas. No entanto, poucas sobreviveram ao comercialismo na indústria de aves para serem usadas pelos criadores modernos de galinhas (North e Bell, 1990). Muitas das raças iniciais são mantidas só por motivos de exibição, algumas perderam-se para sempre, outras são mantidas por estações governamentais de criação para que se necessário estejam disponíveis para criadores especializados (North e Bell, 1990).



Fig.1 – Esta ilustração demonstra a diversidade fenotípica de diferentes raças de galinhas domésticas em comparação com o seu antepassado selvagem, o *Red Jungle Fowl* (um macho e uma fêmea são demonstrados em baixo). (Pintado por Staffan Ullström)

Fonte: www.nature.com/.../n2/images/nrg0201_130a_f1.gif

Inicialmente as práticas de criação estavam confinadas a melhorar o potencial económico das raças puras. Gradualmente duas ou mais raças foram cruzadas para melhorar a sua produtividade. Eventualmente foram criadas novas raças sintéticas, particularmente nas aves criadas para a produção de carne. Apesar de muitas das raças puras terem sido incorporadas na sua produção, estas novas raças sintéticas não representam nenhuma raça ou variedade anterior (North e Bell, 1990).

Algumas variedades e linhas de galinhas têm sido criadas para a produção de carne em vez de ovos. Elas são capazes de produzir ganhos económicos no peso quando criados como frangos de carne. Algumas raças e variedades utilizadas nos programas de reprodução ou usadas para desenvolver linhas sintéticas de frangos de carne são a New Hampshire, a White Plymouth Rock, a Cornish e a Light Sussex (North e Bell, 1990).

1.4- Sistema Digestivo dos Frangos

As aves têm um sistema digestivo monogástrico simples. Os microrganismos não têm tempo nem local para ajudar a digerir o alimento, como nos ruminantes. As aves dependem de secreções enzimáticas para ajudarem a quebrar moléculas complexas em nutrientes simples que possam absorver. O seu sistema digestivo é composto pelo canal alimentar, fígado e pâncreas. Estes órgãos têm a mesma função que nos mamíferos, isto é, ingestão do alimento, armazenamento, digestão e eliminação de resíduos corporais.

Boca e Esófago – As aves não têm lábios nem dentes. O bico é utilizado para apanhar o alimento e para o quebrar até ter um tamanho suficiente para engolir. As glândulas salivares segregam saliva para cobrir e lubrificar as partículas alimentares para facilitar a sua deglutição. A saliva é ligeiramente alcalina e contém a enzima amilase, que tem a capacidade de hidrolisar o amido, convertendo-o em açúcares. Como a comida é retida por pouco tempo na boca a hidrólise aqui é baixa.

Papo e Proventriculo – O papo serve como uma zona de armazenamento temporária, existente no esófago, aqui os alimentos são amolecidos e humedecidos. Aqui nenhuma enzima é produzida mas a amilase que vem da boca continua a hidrolisar o amido (North e Bell, 1990).

O proventriculo ou estômago glandular da ave é um pequeno espessamento de tecido secretório no final do esófago (Parkhurst e Mountney, 1988). É aqui que a enzima pepsina é produzida assim como o ácido clorídrico. A pepsina hidrolisa as moléculas complexas de proteína e o ácido clorídrico muda o conteúdo do canal alimentar de alcalino para ácido e ajuda na digestão das proteínas (North e Bell, 1990).

Moela – Consiste num par de músculos muito grossos e poderosos localizados entre o proventriculo e o duodeno. A moela tritura o alimento ingerido tornando-o mais pequeno e assim mais digestível e isto acontece quando os seus músculos se contraem, por vezes pequenas pedras são engolidas para ajudarem na trituração. Nenhuma enzima é aqui segregada mas a digestão continua como resultado das secreções do proventrículo.

Pâncreas – O pâncreas segrega enzimas tais como tripsina, amilase e lipase que são capazes de hidrolisar proteínas, hidratos de carbono e lípidos. O pâncreas também segrega insulina para regular o metabolismo do açúcar.

Fígado – O fígado produz a bÍlis, um líquido verde e alcalino, e depois armazena-o na vesícula biliar. A principal função da bÍlis é emulsionar as gorduras para que elas possam ser digeridas. A bÍlis é descarregada no intestino delgado mais precisamente no duodeno.

Intestino Delgado – A digestão e a absorção ocorrem no intestino delgado. Estas acções ocorrem rapidamente, em três horas ou menos. A área de superfície para a absorção é elevada permitindo assim que o intestino absorva os nutrientes rapidamente. O intestino delgado é constituído por três porções o duodeno, o jejuno e o íleo. No duodeno continua a digestão dos alimentos com as enzimas que vêm dos outros órgãos anteriores e com as que vêm do pâncreas. É no jejuno que a maior parte da absorção é feita. Quando o alimento deixa a moela este está ácido mas quando passa pelo jejuno e íleo esse conteúdo fica alcalino. É no intestino delgado que a maior parte da digestão é completa.

Ceco – Pensa-se que anteriormente no processo de evolução, o ceco era capaz de digerir fibra através de uma acção microbiana. Hoje em dia as galinhas adultas mesmo com dietas ricas em fibras demonstram pouca evidência de digestão da fibra (Parkhurst e Mountney, 1988).

Intestino Grosso (Cólon) e Cloaca – O intestino grosso é curto. Alguns processos da digestão continuam aqui apesar de nenhuma enzima ser segregada e por isso esta digestão é uma continuação da que se iniciou no intestino delgado. Existe um movimento de água no intestino grosso para que o conteúdo intestinal fique mais sólido.

A cloaca além de guardar o material fecal é uma passagem comum do canal urinário e reprodutivo. O canal urinário esvazia para a cloaca e a urina posteriormente é excretada com as fezes.

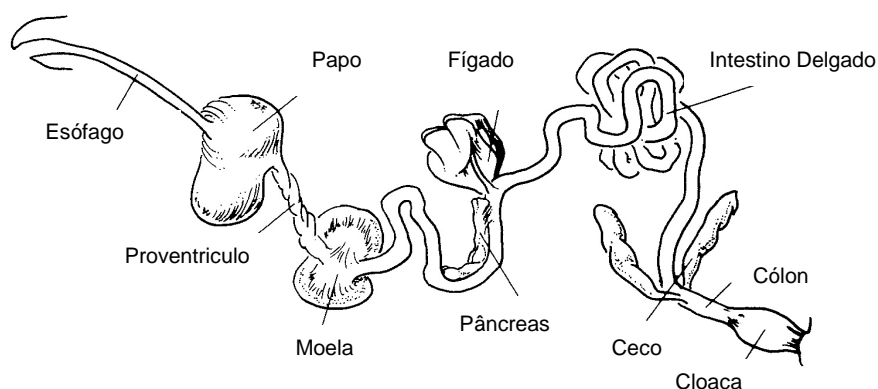


Fig.2 – Esquema do sistema digestivo das aves.

Fonte: (Cheeke, 1991).

2- Cevada (*Hordeum Sativum*)

2.1 – Estrutura do Grão da Cevada

O grão é constituído pelo embrião da planta (germe), o endosperma e pelas camadas exteriores protectoras. A camada mais exterior é a casca, é rica em fibra e protege o grão de estragos mecânicos e da invasão por patogénicos.

Por baixo da casca está a camada de aleurona (farelo) que contém fibra e proteína. Dentro da camada de aleurona está o endosperma, que é constituído principalmente por amido (Cheeke, 1991) que fornece a maior parte da energia. O endosperma constitui a maior parte do grão (Nahas e Lefrançois, 2001).

No interior do endosperma está a semente de embrião, esta é rica em óleo, proteína e outros nutrientes, que a semente utiliza para a sua germinação. O endosperma é a principal reserva de energia para a germinação (Cheeke, 1991).

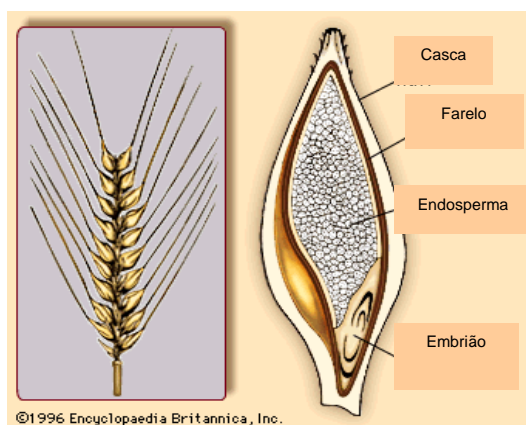


Fig.3 – No lado esquerdo está uma espiga da cevada; No lado direito está um corte longitudinal de um grão de cevada.

Fonte: www.britannica.com

2.2- Composição e Valor Nutritivo

Fibra – A casca (rica em fibra) na maioria das variedades da cevada representa 10 a 14 % do peso do grão (McDonald *et al.*, 2002).

Proteína – A proteína bruta varia de 60 a 160g/kg MS com um valor médio de 120 g/kg MS. Tal como todos os cereais a proteína é de baixa qualidade, sendo particularmente deficiente em lisina (McDonald *et al.*, 2002). Mas comparando com o milho o seu valor e qualidade proteica é superior (Cheeke, 1991).

Lípidos – O conteúdo lipídico da cevada é baixo, normalmente é menor que 25 g/kg MS (McDonald *et al.*, 2002).

Energia – É estimado que a energia no alimento representa 40% do custo de produção de carne e de ovos nas aves, é então importante que a determinação do valor de energia dos alimentos para a formulação das rações seja a mais exacta (Sibbald, 1982).

O valor da energia metabolizável (EM) é aproximadamente de 2750 kcal/kg MS para os frangos (McDonald *et al.*, 2002). O valor baixo de energia deve-se ao baixo conteúdo de amido, ao elevado conteúdo de β -glucanos pouco digeríveis e ao conteúdo elevado de fibra (Cheeke, 1991).

Os valores de EM podem variar com o tipo de cereal e variedade (Classen *et al.*, 1988) e com o ambiente em que o grão de cereal cresce (Jeroch e Dänicke, 1996).

2.3 – Composição da Fibra

Existem dois tipos de fibras: fibra insolúvel em água e fibra solúvel em água. A fibra solúvel em água corresponde quimicamente com os polissacáridos não amiláceos solúveis em água. As fibras solúveis em água incluem o β -glucano da cevada. A fibra insolúvel em água é constituída por material da parede celular insolúvel que é composto por celulose, hemicelulose, substâncias peptídicas, proteína e lenhina. A proporção destes componentes varia muito, dependendo da origem do material da planta (Cole e Haresign, 1989).

2.4 – O uso da cevada na alimentação dos frangos

Os cereais podem ser classificados em duas categorias, cereais viscosos e não viscosos, dependendo do seu conteúdo em PNA solúveis. A cevada por conter um teor elevado de PNA solúveis é classificada como “grão viscoso” (Choct, 2006).

A utilização de cevada inteira em grande quantidade pode causar problemas graves devido aos PNA solúveis em água e altamente viscosos (Brenes *et al.*, 1993). A maior parte

do endosperma da cevada e o componente da parede celular aleurona, β -glucano, constitui aproximadamente 75% da parede celular (Svihus *et al.*, 1997a).

O β -glucano é um polímero de glucose que contém uma mistura de ligações β -1,3 e β -1,4 que faz com que as suas propriedades sejam totalmente diferentes da celulose que é um polímero de glucose de cadeia direita com ligações só de β -1,4 (Choct, 2006).

As concentrações de β -glucano variam com a cultivar, as condições de crescimento, a origem geográfica, estado de maturação na colheita e as condições de armazenamento da cevada (Aastrup, 1979).

Os efeitos nocivos dos PNA solúveis (β -glucanos) estão associados com a sua capacidade de aumentar a viscosidade do *digesta*, com a sua interacção com a microflora do intestino e por alterar a fisiologia do aparelho digestivo (Choct, 2006). O aumento da viscosidade do *digesta* prejudica a digestão e a absorção nas aves (Choct, 2006) e tem um efeito negativo na ingestão alimentar (Campbell *et al.*, 1984). Estes efeitos provocam posteriormente uma redução na taxa de crescimento, e também aumenta a incidência de fezes molhadas e pegajosas que podem causar problemas nas patas e danificar o peito o que resulta em produtos de qualidade reduzida (Chesson, 1991). Outra possível explicação para a redução do peso vivo é que a parede celular do endosperma intacta pode manter os nutrientes encapsulados e consequentemente reduzir a sua disponibilidade para a digestão e absorção no intestino delgado (Hesselman e Åman, 1986). Os PNA solúveis aumentam a actividade microbiana no intestino e isto está também associado com uma baixa performance no crescimento (Hübner *et al.*, 2002). Esta actividade deve-se ao facto do trânsito alimentar estar lento e por isso as bactérias intestinais são capazes de se multiplicar e migrar para zonas mais superiores do intestino delgado (Bedford, 1993). A microflora vai também digerir e utilizar o amido e as proteínas do *digesta*, e efectivamente competir com o hospedeiro por nutrientes (Bedford, 1993). Algumas enzimas degradam a bÍlis, utilizada na digestão dos lípidos, e isto parece que é parcialmente responsável pela baixa performance dos frangos (Józefiak *et al.*, 2006). Estes efeitos que os β -glucanos produzem nos frangos vão influenciar o valor nutritivo da cevada (Nahas e Lefrançois, 2001). A resposta das aves a dietas altamente viscosas é produzir um íleo mais longo (Yasar e Forbes, 1999) e/ou mais pesado (Steenfeldt, 2001).

Para além dos PNA solúveis a cevada contém também grandes quantidades de celulose (Bach Knudsen, 1997). Tem sido demonstrado que grandes quantidades da casca, que contém celulose, nas dietas dos frangos diluem a energia metabolizável e causa um aumento do índice de conversão (Carré *et al.*, 1990). Variedades de cevada sem casca, com o conteúdo de fibra reduzido, têm sido desenvolvidas para o uso na alimentação das galinhas (Rossnagel *et al.*, 1983), mas variedades seleccionadas para reduzir factores anti-nutritivos (β -glucanos) não estão disponíveis (Scott *et al.*, 1998a).

Muitas técnicas de processamento, particularmente a granulação e a extrusão, resultam em danos significativos nas paredes celulares do endosperma e na gelatinização do amido. Isto normalmente resulta num aumento da digestibilidade e em melhorias no peso ganho e no índice de conversão. No entanto, o processamento somente não é normalmente suficiente para aumentar a digestibilidade (Bedford, 1993) por isso a utilização de enzimas exógenas.

3 – Enzimas

3.1 – O que são e qual a sua função.

Todas as enzimas são proteínas, mais concretamente proteínas globulares (têm uma forma esferóide e são hidrossolúveis). As enzimas são, de entre todos os tipos de catalizadores, os mais eficientes. Enquanto um catalizador não enzimático pode aumentar 100 a 10.000 vezes a velocidade de reacção, algumas enzimas são capazes de multiplicar por um factor 10^{20} (Campos, 1999).

A energia de activação requerida para iniciar um processo químico pode ser fornecida através de uma elevação de temperatura que aumente a agitação molecular. Em bioquímica a temperatura dos sistemas não pode ultrapassar os valores compatíveis com a vida dos organismos (o aquecimento provoca, nomeadamente, a desnaturação das proteínas). É neste momento que as enzimas (catalizadores bioquímicos) intervêm ao baixar a energia de activação necessária à reacção e permitindo que esta decorra a uma velocidade muito mais elevada (Campos, 1999).

3.2 - Enzimas digestivas

O alimento antes de ser utilizado para a manutenção de tecidos, para o crescimento ou como fonte de energia química, o animal tem que o digerir. A digestão é principalmente um processo químico complexo no qual enzimas digestivas especiais catalisam a hidrólise de grandes moléculas de alimentos em compostos mais simples pequenos o bastante para atravessar a membrana celular da barreira intestinal.

Todas as enzimas digestivas fazem hidrólise, adicionando H^+ a um resíduo e OH^- a outro. A hidrólise da ligação anidro liberta os resíduos (p. ex., monossacários, aminoácidos, monoglicerídios) que formam o polímero, tornando-os pequenos (figura 4).

As enzimas digestivas exibem especificidade ao substrato e são sensíveis a temperatura, pH e a certos iões (Randall *et al.*, 2000). O que confere a sua especificidade muito elevada é a sua natureza proteica (Campos, 1999). Existem três principais grupos de

enzimas digestivas, que correspondem aos três tipos de constituintes dos alimentos: proteases, carboidrases e lipases.

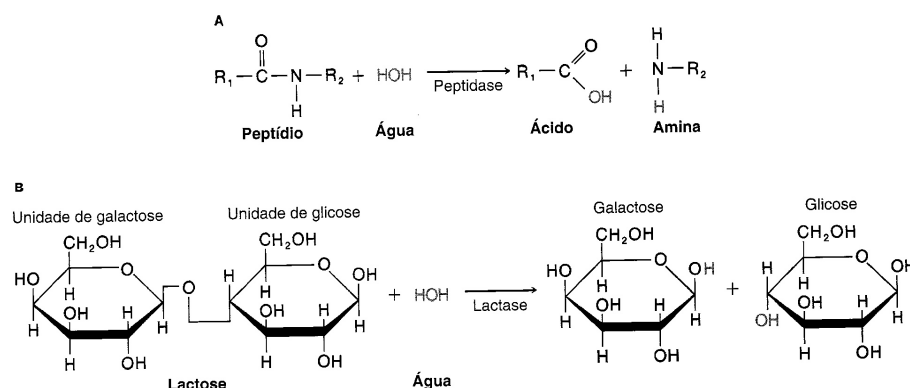


Fig.4 – (A) Péptidos e (B) dissacarídeos são quebrados por hidrólise, sob acção catalítica enzimática. Como mostrado, uma molécula é adicionada aos dois resíduos quebrando a ligação covalente que os mantém juntos.

Fonte: (Randall *et al.*, 2000).

3.3 – Enzimas Exógenas em Alimentação Animal

Nem todos os componentes dos alimentos são hidrolisados pelas enzimas digestivas, então alguns potenciais nutrientes estão indisponíveis. Por isso nos últimos 20 a 25 anos têm havido um interesse considerável no uso de enzimas exógenas.

As enzimas exógenas são usadas porque aumentam o valor alimentar dos ingredientes, reduzem a variação da qualidade dos nutrientes (a resposta é maior nos ingredientes de qualidade mais baixa) e reduzem a incidência de camas molhadas (Bedford, 2000). Pode-se dizer que estes benefícios estão associados à redução da actividade bacteriana no íleo, esta redução deve-se à redução dos nutrientes disponíveis para a fermentação microbiana (Silva e Smithard, 2002).

Pode dizer-se que as enzimas exógenas trabalham em duas fases, que podem ser descritas como a fase ileal e a fase cecal (Bedford e Apajalahti, 2001). Durante a fase ileal, elas evitam a formação de *digesta* viscoso, durante a fase cecal, os produtos degradados dos PNA solúveis no íleo são fermentados por micróbios cecais, e assim estimulando a produção ácidos gordos de cadeia curta como o acetato, propionato e butirico (Józefiak *et al.*, 2006). Tem sido sugerido que os produtos finais da fermentação microbiana no intestino das galinhas podem contribuir com alguma energia à ave hospedeira (Jamroz *et al.*, 2002) e pode posteriormente ter um papel importante na regulação da população da microflora.

3.3.1 – Carboidrases

Os monogástricos não produzem enzimas capazes de digerir celulose, β -glucanos, arabinoxilanos ou pectinas. Tem havido muito interesse neste facto e em maneiras de remover estes polímeros que encapsulam os conteúdos desejados do endosperma (Bedford, 1993).

As enzimas utilizadas nos grãos viscosos são as que receberam mais atenção das enzimas que hidrolisam os PNA. A adição de enzimas apropriadas diminui os efeitos que os grãos viscosos produzem e permite que a digestão ocorra completamente e rapidamente (Bedford, 2000). Então o resultado da adição das enzimas é aumentar a taxa de digestibilidade dos nutrientes. Isto é importante porque move o local de digestão e absorção do amido e proteína para um local mais anterior do tubo digestivo onde a ave tem uma maior vantagem sobre a microflora residente, tal como acontece com os alimentos altamente digestivos. É mais importante nas aves adultas onde essa microflora é maior (Bedford, 2000).

As β -glucanases utilizadas na degradação dos β -glucanos na cevada têm provado ser eficientes no aumento do valor nutritivo deste grão na alimentação das aves em particular nos frangos de carne. Por isso no futuro o uso de enzimas para obter os PNA como fontes de energia irá aumentar (Choct, 2006).

A inclusão da β -glucanase em dietas à base de cevada melhora a performance, pode reduzir o peso do aparelho digestivo no total em 13 %, que representa 1 % do peso total da ave, assim melhora o rendimento da carcaça (Brenes *et al.*, 1993).

A suplementação enzimática aumenta o valor da EM da cevada que tenha valores elevados de PNA, e decresce a variação da EM, que é causada por estes factores anti-nutritivos. A β -glucanase também reduz a capacidade dos PNA solúveis de reterem água e a sua viscosidade associada, melhorando assim a absorção (Johnson e Gee, 1981). As reduções da viscosidade do *digesta* podem reduzir significativamente o tempo de retenção do *digesta* no aparelho digestivo e aumentar a ingestão voluntária (Albustany, 1996).

Quadro 1 – Efeito da adição da β – glucanase em dietas com cevada sem casca (scout) no consumo do alimento, ganho de peso e taxa de ganho:alimento em frangos de carne (Adaptado de Rotter, B.A., 1989,)

Fonte: (McDonald *et al.*, 2002).

Frangos (0-6 Semanas) Tipo de Dieta	Ingestão (g)	Ganho de Peso Vivo (g)	Ganho: Alimento
Trigo	2910	1529	0.525
Cevada	2941	1473	0.501
Cevada + Enzima	2992	1638	0.547

Frangos (3 Semanas) Tipo de Dieta	Ingestão Cumulativa (g)	Peso Vivo (g)	Ganho: Alimento
Milho	1002	756	0.713
Cevada	987	593	0.569
Cevada + Enzima	1001	746	0.705

As enzimas singulares (β -glucanases) que são capazes de atacar as ligações β -1,4 e β -1,3 dos β -glucanos da cevada podem rapidamente destruir a integridade do polímero *in situ* causando uma ruptura da parede celular do endosperma. A integridade das paredes de outro tipo de células encontradas na cevada como a aleurona que possuem um conteúdo muito mais baixo de β -glucanos continuam sem ser afectadas pelo tratamento só de β -glucanase (Chesson, 1991). Assim preparações enzimáticas contendo actividades celulolíticas e xilanolíticas são necessárias para maximizar a libertação de proteína das células da aleurona da cevada (Murison *et al.*, 1989).

Quadro 2 – Libertação de proteína de células isoladas da aleurona por preparações de β -glucanase comercial e celulase.

Fonte: (Murison *et al.*, 1989).

Enzima ¹	Tempo de Incubação (h)	Proteína Libertada (mg proteína/g preparações de paredes lavadas)
Glucanase ²	6	14.4
	24	16.7
"Celulase"	6	20.2
	24	22.4

1. A concentração das duas preparações enzimáticas foram ajustadas para a mesma actividade da β - (1,4) -glucanase.
2. Apesar de estar marcada como β -glucanase, a preparação demonstrou alguma actividade celulolítica.

A celulose é uma cadeia direita de β -glucano (1,4) e necessita de uma combinação das enzimas celobiohidrolase, endoglucanase e de β -glucosidase para a sua hidrólise total em glucose. O β -glucano (1,3), (1,4) da cevada pode ser rapidamente hidrolisado em glucose com a combinação enzimática de endoglucanase e β -glucosidase (Choct, 2006).

As enzimas para serem eficazes quando são incorporadas na dieta dos animais têm que sobreviver ao armazenamento, à temperatura ambiente, ao processo de fabricação (aquecimento e granulação) e às variações de pH no intestino, ser resistente às proteases intestinais e ter uma actividade específica nos componentes alimentares no intestino delgado. As enzimas devem ser escolhidas com base no substrato alvo. As enzimas comerciais têm uma origem muito variada, particularmente de fungos como *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus niger* e *Humicola insolens* (McDonald *et al.*, 2002).

4 – Carbohydrate-Binding Module (CBM)

A estrutura química e física complexa da parede celular das plantas restringe o acesso das enzimas aos polisacáridos, principalmente celulose e hemicelulose, que constituem esta macromolécula composta (Najmudin *et al.*, 2006). Celulases e hemicelulases microbianas normalmente contêm CBMs não catalíticos que ligam estas enzimas a locais específicos dentro da parede celular da planta (Boraston *et al.*, 2004).

Os CBMs estão actualmente agrupados em 52 famílias de sequências bases que demonstram especificidade de ligação para diferentes enzimas e substratos (Coutinho e Henrissat, 2003).

O CBM liga as enzimas modulares aos polisacáridos solúveis ou insolúveis (tal como a celulose), e funciona ao aumentar a concentração enzimática na superfície dos substratos, e assim potencia a actividade nos domínios catalíticos associados (Fernandes *et al.*, 1999).

5 – Objectivo

Este trabalho tem como objectivo avaliar os efeitos da suplementação enzimática nos frangos em dietas à base de cevada e avaliar o efeito que o CBM tem quando adicionado às enzimas modulares.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

Este ensaio foi realizado nas instalações experimentais da secção de Produção Animal do Instituto Superior de Agronomia em parceria com o Departamento de Produção Animal e Segurança Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e teve como objectivo o estudo dos efeitos da suplementação enzimática de dietas à base de cevada, tendo como parâmetros:

- Performances zootécnicas dos frangos de carne: peso corporal, consumo de alimento, índices de conversão.
- Actividade enzimática ao longo do tracto gastrointestinal
- Dimensão do tracto gastrointestinal
- Viscosidade do *digesta*

1. Alimento

Foi fornecido um alimento concentrado base a todas as aves. A sua composição e análise química são descritas no quadro 4.

Quadro 3 – Composição e análise química do alimento concentrado base.

Ingredientes	%
Cevada	55.00
Bagaço de Soja 47%	30.603
Milho	5.450
Óleo de Soja	5.731
Sal Marinho	0.25
Carbonato de Cálcio	0.814
Fosfato Dicálcico 18%	1.786
DL-Metionina	0.161
Premix (Vit + Oligo)	0.20
Enzima	0.005
Análise Química	%
Energia Metabolizável Aparente (kcal/kg)	2900
Proteína Bruta	20.8
Gordura Bruta	7.33
Fibra Bruta	4.87

Na preparação do alimento concentrado base a cevada, o milho, e o bagaço de soja, moídos, foram colocados no misturador. Preparou-se à parte uma mistura com os restantes ingredientes e depois adicionou-se aos ingredientes principais. Procedeu-se à sua mistura durante 7 minutos. De seguida procedeu-se à sua granulação e deixou-se arrefecer. Após o arrefecimento a ração foi armazenada em caixas de plástico até à sua utilização.

2. Animais e Instalações

Adquiriram-se 300 pintos do dia da estirpe *Ross 308*, machos, dos quais foram seleccionados 160 que tinham um peso aproximado. Os animais seleccionados foram marcados nas asas com anilhas e pesados novamente. Fez-se a sua distribuição por 40 gaiolas, ficando 4 animais por gaiola. Nesta distribuição teve-se o cuidado de que os perfis de peso em cada gaiola fossem idênticos.

Na sala onde decorreu o ensaio as gaiolas estavam dispostas em duas fileiras com dois níveis. Entre as fileiras existe uma fossa central para onde os resíduos escoam. Cada uma das gaiolas tem uma área de 2750 cm² (688 cm²/ ave), comedouro (8,5 cm/ ave) e dois bebedouros de pipeta. A altura dos comedouros e dos bebedouros foi ajustada à medida que as aves cresceram.

A temperatura da sala foi controlada através de um ar condicionado, de um aquecedor eléctrico e por lâmpadas, colocada uma por cada duas gaiolas. A renovação do ar foi feita através de um ventilador.

A sala foi aquecida antes da entrada dos animais, para que a temperatura ambiente fosse de 27-28 °C (30 °C dentro das gaiolas). A temperatura foi controlada diariamente através de um termómetro. A temperatura foi diminuída ao longo do ensaio de 28 °C (1º dia) para 21 °C (24º dia) e foi mantida nos 21 °C até ao final. No 21º dia as lâmpadas de 150 Watt que inicialmente foram colocadas foram retiradas e substituídas por umas de menor potência (25 Watt).

O crescimento dos animais foi controlado através da sua pesagem semanal. A ração fornecida diariamente foi pesada e no final de cada semana o refugo era também pesado. A mortalidade foi registada diariamente.

No final do ensaio abateram-se as aves aos 28 dias de idade. Antes do abate forneceu-se alimento para que houvesse conteúdo no aparelho digestivo. Abateram-se quarenta aves, 1 ave por gaiola, por injeção letal de 0,12 g a 0,25 g de Tiopental. Fez-se a pesagem do papo, da moela e do fígado e mediu-se o duodeno, o jejuno, o íleo e os cecos. Fez-se a recolha de amostras dos conteúdos dos diferentes órgãos do tracto gastrointestinal. Colocaram-se os conteúdos dos papos, das moelas, dos duodenos, dos jejunos, dos íleos e dos cecos em *ependorfs* devidamente identificados e conservaram-se

em gelo até coloca-los no congelador, onde foram guardados para que pudessem ser usados posteriormente na análise da actividade enzimática. Colocaram-se também o conteúdo do duodeno + jejuno e do íleo em *greiners* devidamente identificados até serem utilizados na medição da sua viscosidade.

3. Tratamentos

As aves foram submetidas a 5 tratamentos, que consistiram na suplementação enzimática ou não do alimento concentrado base. O tratamento C- (controlo negativo) não foi suplementado com enzimas. Os tratamentos 100 H1 e 33 H1 foram suplementados com a enzima modular GH26-GH5 (β -glucanase - Celulase) tendo um valor de unidade de actividade enzimática (U) diferente 2000 U/kg e 700 U/kg respectivamente. Os tratamentos 100 H2 e 33 H2 foram suplementados com a enzima modular GH26-GH5-CBM11 (β -glucanase – Celulase – carbohydrate-binding module) tendo um valor de U diferente 2000 U/kg e 700 U/kg respectivamente. A unidade de actividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para libertar um μ mole do produto por minuto. A representação da H1 e da H2 está na figura 5.

H1: (GH26-GH5 (β -glucanase - Celulase))



H2: GH26-GH5-CBM11 (β -glucanase – Celulase – carbohydrate-binding module)

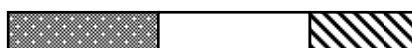


Fig.5 – Representação esquemática das enzimas modulares H1 e H2.

Os cinco tratamentos foram distribuídos pelas 40 gaiolas. Cada tratamento foi replicado 8 vezes.

Optou-se por adicionar as enzimas após o processo de granulação porque neste processo o alimento pode atingir 80 °C, o que provoca a desnaturação das enzimas exógenas.

As rações de cada tratamento foram preparadas diariamente. Em cada tratamento misturou-se 1 kg de ração base com 30 g de excipiente correspondente ao tratamento, no misturador durante 3 minutos, e armazenou-se o alimento no respectivo recipiente até à sua utilização. O excipiente consiste em farinha seca que tem como função melhorar a distribuição das enzimas pela ração, devido à quantidade utilizada ser muito baixa em comparação com a ração. No tratamento C- o excipiente é adicionado mas não é

suplementado com enzimas. O alimento foi fornecido *ad libitum*, sendo a quantidade de alimento distribuído ajustado diariamente em função das suas necessidades.

4. Análises Laboratoriais

Na medição da viscosidade utilizaram-se os conteúdos do duodeno + jejuno e íleo recolhidos como anteriormente se referiu. Foram utilizados logo após a sua recolha procedendo-se a uma centrifugação a 9000 rotações/ minuto durante 10 minutos numa centrifugadora (Beckman J2-HS). Após a centrifugação recolheu-se o sobrenadante e colocou-se no prato aquecido do viscosímetro (Brookfield cone and plate LVCDVII) para medir a viscosidade em cpo. A velocidade do prato foi de 6 rotações por minuto e com uma temperatura de 25 °C.

A viscosidade do alimento de cada tratamento foi também medida. Para tal realizou-se uma digestão *in vitro* de cada alimento e o resultado dessa digestão foi utilizado do mesmo modo que os conteúdos dos órgãos referidos acima. Para essa digestão foram trituradas aproximadamente 100 g de cada ração por tratamento, retirou-se 10 g às quais se adicionou 10 ml de solução tampão (pH 6,5). Estas amostras foram a incubar durante 30 minutos a 40 °C.

Determinou-se a actividade enzimática de cada tratamento nas várias fracções do tubo digestivo. Retiraram-se as amostras do *digesta* dos diferentes órgãos do congelador, e deixou-se descongelar. Depois centrifugaram-se as amostras na centrifugadora (Biofuge pico – Heraeus) a 13000 rotações por minuto (rpm) durante 10 a 15 minutos até obter um sobrenadante suficiente para análise. Colocou-se o sobrenadante nos vários orifícios, feitos no agar, dentro das placas de petri. O agar colocado nas placas de petri era constituído por: 8 g de agar, 400 ml de tampão e 0,4 g de β -glucano da cevada a 0,1%. Um litro da solução tampão é constituída por 1,21 g de Tri-Hcl a 10 mM, HCL a 5 M o suficiente para o pH atingir 7,5 e água até perfazer o litro. Depois de colocar o sobrenadante nas placas de petri colocaram-se estas na estufa a 37°C de um dia para o outro. No dia a seguir colocou-se o vermelho de congo a 1% nas placas de petri e deixou-se actuar durante 30 minutos. Depois retirou-se o vermelho de Congo e lavaram-se as placas até o excesso ser retirado. Colocou-se descolorante e verificou-se os resultados. A actividade foi medida numa escala de - a ++, sendo o valor “-” representativo da ausência de actividade enzimática, o valor “+” representativo de actividade enzimática e o valor “++” representativo de maior actividade enzimática.

Também se utilizou a análise de zimogramas para determinar a actividade enzimática e para verificar a estabilidade das enzimas nos vários órgãos do aparelho digestivo. Fizeram-se os géis de poliacrilamida ou PAGE (de PolyAcrylamide Gel

Electrophoresis) com inclusão de 0.1% de β -glucano da cevada. Centrifugaram-se as amostras e retiraram-se 20 μ l do sobrenadante e colocaram-se em *eppendorfes*. A este juntou-se 5 μ l de tampão SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) e colocaram-se os *eppendorfes* em água e deixou-se a ferver durante 3 minutos. Colocou-se depois esta mistura nos poços dos géis e deixou-se correr a 12 mv por gel durante 1h30m. Depois da electroforese lavaram-se os géis cinco vezes durante 30 minutos com uma solução de 200 mM de succinato de sódio, pH 6,3, contendo 10 mM de CaCl_2 e 1 mM de DTT para que os polipeptídios fossem renaturados. Posteriormente colocaram-se os géis na estufa a 60 °C durante 40 minutos em banho de solução de lavagem. Após esse tempo decorrido adicionou-se a solução corante de coumassie (actua sobre o SDS). Depois descorou-se completamente com uma solução descorante (100 ml ácido acético + 400 ml metanol + 500 ml de H_2O Helix) que actuou 20 minutos de cada vez. De seguida lavou-se o gel numa solução de 0,1 mM Tri-HCl, pH 8, durante 20 minutos. Com a solução 0,1% de vermelho de congo fez-se a coloração dos géis durante 15 minutos para que depois fosse possível detectar as zonas de hidrólise. Depois para retirar o excesso de corante lavaram-se os géis com uma solução de 1M NaCl durante 30 minutos. Para escurecer o fundo adicionou-se ácido acético a 0,5%. Os géis foram fotografados de modo a registar os resultados obtidos.

5. Análise estatística

Os resultados foram sujeitos a uma análise de variância de acordo com o procedimento GML.

Diferenças entre médias de cada parâmetro analisado foram testadas com o teste de Duncan, com o programa estatístico SAS (2001). Diferenças entre médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Capítulo 4 – Resultados

1. Performances dos Frangos

Ao analisar o quadro 4 verifica-se que as médias de alimento ingerido não são significativamente diferentes entre tratamentos na 1ª, 3ª e 4ª semana.

Quadro 4 – Média de alimento (g) ingerido por animal em cada tratamento

Tratamento	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
C- (g)	142.7	348.9 ^{ab}	586.6	938.8
100 H1 (g)	151.2	367.9 ^{ab}	597.8	972.9
33 H1 (g)	149.6	360.9 ^{ab}	592.9	932.0
100 H2 (g)	147.3	337.3 ^b	572.1	970.1
33 H2 (g)	147.6	377.6 ^a	599.2	915.9

No quadro 5 verifica-se que as médias do alimento total ingerido não são significativamente diferentes.

Quadro 5 – Média do alimento (g) total ingerido por animal em cada tratamento

Tratamento	Alimento Total Ingerido
C-	2016.81
100 H1	2076.42
33 H1	2035.39
100 H2	1990.61
33 H2	1922.11

No quadro 6 verifica-se que o tratamento 100 H1 teve significativamente melhores médias do peso do que o tratamento C- na 1ª e 3ª semana e o tratamento 33 H1 só na 1ª semana. Para além disso o tratamento 100 H1 tem as médias do peso significativamente maior do que no tratamento 100 H2 na 1ª, 2ª e 3ª semana apesar de este ter o CBM.

Quadro 6 – Média de peso (g) por animal em cada tratamento.

Tratamento	Peso Inicial	Peso 1ª Semana	Peso 2ª Semana	Peso 3ª Semana	Peso 4ª Semana
C- (g)	49.5	151.4c	377.9ab	723.2b	1234.2
100 H1 (g)	49.1	166.8a	406.1a	788.6a	1283.7
33 H1 (g)	49.4	164.7ab	406.7a	761.2ab	1267.3
100 H2 (g)	49.2	155.0bc	370.3b	715.8b	1201.0
33 H2 (g)	49.2	154.9bc	393.7ab	761.3ab	1275.6

No quadro 7 observam-se os valores médios dos índices de conversão (IC). Pode-se observar que o tratamento 100 H1 apresenta significativamente menores médias de IC que o tratamento C- na 1ª e 3ª semana e o tratamento 33 H1 só na 1ª semana. Verifica-se que o tratamento 100 H1 tem as médias dos IC significativamente menores que o tratamento 100 H2 na 1ª, 2ª e 3ª semana apesar de este ter o CBM.

Quadro 7 – Média de IC por tratamento

Tratamento	1ª Semana	2ª Semana	3ª Semana	4ª Semana
C-	1.444 ^a	1.590 ^{ab}	1.735 ^a	1.905
100 H1	1.255 ^c	1.524 ^b	1.556 ^b	1.962
33 H1	1.280 ^{bc}	1.493 ^b	1.688 ^{ab}	1.917
100 H2	1.394 ^{ab}	1.695 ^a	1.750 ^a	2.020
33 H2	1.397 ^{ba}	1.521 ^b	1.626 ^{ab}	1.891

No quadro 8 verifica-se que as médias do IC total não são significativamente diferentes.

Quadro 8 – Média do IC total por tratamento

Tratamento	IC
C-	1.669
100 H1	1.574
33 H1	1.594
100 H2	1.715
33 H2	1.609

No quadro 9 verifica-se que as médias de peso do papo e do fígado não são significativamente diferentes. A média do peso da moela no tratamento 100 H2 é significativamente maior do que as médias dos tratamentos 33 H1 e 33 H2.

Quadro 9 – Média do peso relativo (g/kg P.V.) dos órgãos em análise.

Tratamento	Papo	Moela	Fígado
C-	4.59	16.75 ^{ab}	35.75
100 H1	4.07	17.22 ^{ab}	35.00
33 H1	4.36	15.98 ^b	35.96
100 H2	4.17	19.61 ^a	36.51
33 H2	4.03	15.92 ^b	36.23

No quadro 10 observa-se que não existem diferenças significativas nas médias dos comprimentos relativos do duodeno, jejuno, íleo e cecos entre tratamentos.

Quadro 10 – Média de comprimento relativo (cm/kg P.V.) dos órgãos em análise.

Tratamento	Duodeno	Jejuno	Íleo	Cecos
C-	20.86	55.91	61.58	13.27
100 H1	20.42	58.91	61.10	13.34
33 H1	21.93	61.15	63.97	14.40
100 H2	21.75	56.20	61.35	14.78
33 H2	19.50	56.35	59.73	13.33

2. Viscosidades

Na figura 6 verifica-se que a viscosidade do alimento no tratamento 100 H2 com CBM é significativamente menor que nos restantes tratamentos, e que a viscosidade do alimento no tratamento C- é significativamente maior do que os outros tratamentos excepto o 33 H1.

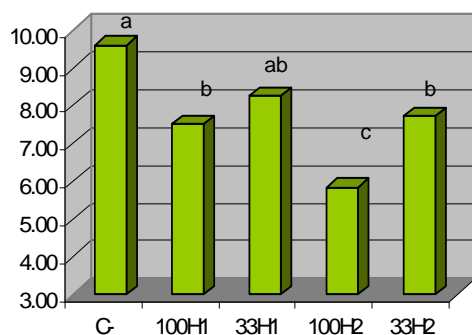


Fig.6 – Gráfico da viscosidade (medida em cpo) do alimento de cada tratamento.

Na figura 7 observa-se que as viscosidades do *digesta* do duodeno+jejuno e íleo não são significativamente diferentes entre tratamentos.

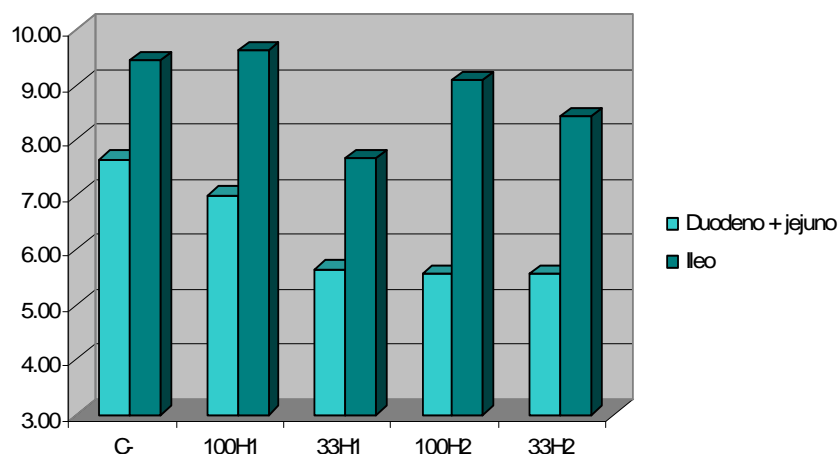


Fig.7 – Gráfico da média de viscosidade (cpo) do *digesta* do duodeno+jejuno e íleo.

3. Actividade enzimática

A detecção da actividade enzimática pode ser observada na figura 8 onde as zonas descoloradas demonstram que houve hidrólise do β -glucano pela β -glucanase presente no *digesta* dos vários órgãos. As zonas menos descoloradas indica-nos que houve hidrólise e as que estão mais descoloradas indica-nos que a hidrólise foi maior, fez-se uma classificação subjectiva onde classificámos de - (não houve hidrólise), + (houve hidrólise) e ++ (houve maior hidrólise) e de zero quando não existia amostra. Como exemplo se pode ver na figura 8 no caso da gaiola 13 referente ao tratamento 100 H1 na moela, no duodeno, no jejuno e no íleo a classificação foi de - e no papo e no ceco de +.



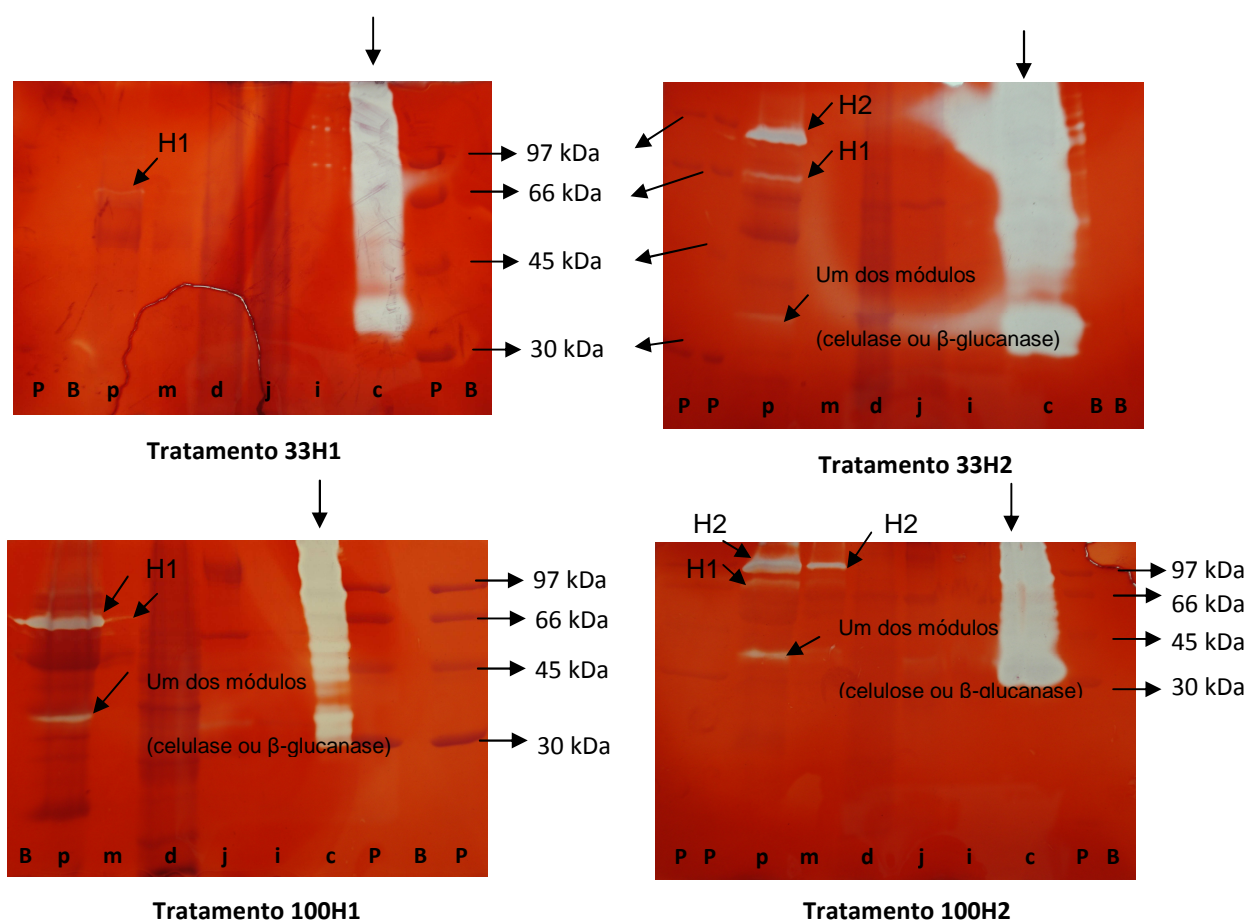
Fig.8 – Detecção da actividade enzimática no *digesta* dos vários órgãos analisados dos diferentes tratamentos. Onde as letras representam os órgãos onde a actividade enzimática está a ser analisada (o P é o papo, o M é a moela, o D é o duodeno, o J é o jejuno, o I é o íleo e o C é os cecos) e os números representam as gaiolas de diferentes tratamentos.

No quadro 11 pode-se verificar que a actividade enzimática está presente no papo e nos cecos em todos os tratamentos. No tratamento 100 H2 com CBM a actividade é evidenciada nos restantes órgãos mas em menor escala.

Quadro 11 – Classificação da actividade enzimática, por tratamento e fracção do tubo digestivo.

Nº Amostra	Nº Animal	Tratamento	Papo	Moela	Duodeno	Jejuno	Ileo	Cegos
1	1	C-	-	-	-	-	-	++
2	6	C-	+	-	-	-	-	+
3	10	100 H1	+	-	-	-	-	+
4	15	100H1	-	-	-	-	-	+
5	20	33H1	-	-	-	-	-	0
6	25	33H1	++	-	-	-	-	0
7	26	100H2	++	-	-	-	-	+
8	33	100H2	+	-	-	-	-	++
9	37	33H2	+	-	-	-	-	0
10	41	33H2	+	-	-	-	-	+
11	42	C-	-	-	-	-	-	++
12	46	C-	-	-	-	-	-	+
13	50	100H1	++	-	-	-	-	0
14	55	100H1	+	-	-	-	-	+
15	59	33H1	-	0	-	-	-	+
16	63	33H1	+	-	-	-	-	+
17	69	100H2	++	-	-	-	+	++
18	71	100H2	++	-	-	-	+	+
19	75	33H2	-	-	-	-	-	-
20	81	33H2	-	-	0	-	-	-
21	82	C-	-	-	-	-	-	++
22	87	C-	-	-	-	-	-	+
23	93	100H1	+	-	-	-	-	++
24	95	100H1	+	-	-	-	-	++
25	101	33H1	+	-	-	-	-	+
26	106	33H1	-	-	-	-	-	++
27	109	100H2	++	-	-	-	-	++
28	115	100H2	+	-	-	-	-	++
29	117	33H2	-	-	-	-	-	0
30	124	33H2	-	-	-	-	-	0
31	127	C-	-	-	-	-	-	0
32	130	C-	-	-	-	-	-	++
33	137	100H1	+	-	-	-	-	++
34	140	100H1	-	-	-	-	-	++
35	145	33H1	-	-	-	-	-	++
36	153	33H1	++	+	-	-	-	++
37	154	100H2	++	+	+	+	-	++
38	157	100H2	+	-	-	-	+	0
39	163	33H2	+	-	-	-	-	0
40	167	33H2	+	-	-	-	-	++

Na figura 9 estão os zimogramas de cada tratamento suplementado com enzimas. Estes demonstram, para além da actividade enzimática, a estabilidade das enzimas nos vários componentes do aparelho digestivo. As zonas descoloradas representam a hidrólise do β -gucano pela β -glucanase. A massa molecular da enzima utilizada no tratamento H1 é de 66kDa e a do tratamento H2 é de 85kDa. Verifica-se que no tratamento 33 H1 e 33 H2 existe actividade enzimática no papo. No tratamento 100 H1 e 100 H2 existe actividade enzimática no papo e na moela. Em qualquer um dos zimogramas verifica-se que as enzimas estão propensas à divisão proteolítica, sendo menor no papo e depois completamente na moela nos tratamentos 33 H1 e 33 H2 e no duodeno nos tratamentos 100 H1 e 100 H2, e nos restantes órgãos. A actividade enzimática que se pode evidenciar nos cecos em qualquer um dos tratamentos é devido à flora microbiana presente nos mesmos.



P representa o padrão usado (com o peso molecular em kDa assinalado nas figuras), **B** é representativo de poços sem amostra, **p** corresponde à amostra do conteúdo do papo, **m** corresponde à amostra do conteúdo do moela, **d** corresponde à amostra do conteúdo do duodeno, **j** corresponde à amostra do conteúdo do jejuno, **i** corresponde à amostra do conteúdo do íleo e **c** corresponde à amostra do conteúdo do cecos.

Fig.9 – Zimogramas de amostras de conteúdos dos órgãos do tubo digestivo, pertencente a um animal de cada tratamento.

Capítulo 5 – Discussão

As performances dos frangos neste ensaio quando comparadas com as performances esperadas dos frangos da estirpe Ross 308 (ver anexo 1) são inferiores. Isto pode ser devido a algumas falhas nas lâmpadas, pois a falta de luz pode limitar a performance das aves (Ross, 2008). E também o facto de no final do ensaio se ter verificado que algumas aves não eram machos como se pensava veio diminuir a performance, pois as fêmeas têm uma menor ingestão de alimento, um menor peso e um maior IC.

A suplementação enzimática em dietas à base de cevada aumenta a ingestão de alimento, devido provavelmente à diminuição da viscosidade (Hesselman *et al.*, 1982 e Pettersson *et al.*, 1991), e melhora a disponibilidade dos nutrientes (Elwinger e Saterby, 1987 e Pettersson *et al.*, 1991), isto resulta num aumento do peso final (Svihus *et al.*, 1997b) e na diminuição do IC, ou seja, melhora a performance dos frangos. Neste trabalho não houve aumentos significativos da ingestão de alimento devido à suplementação enzimática na 1ª, 3ª e 4ª semana. Houve melhorias dos pesos e dos IC na 1ª e 3ª semana no tratamento 100 H1 e na 1ª semana no tratamento 33 H1. Estas melhorias podem ser devido ao aumento da disponibilidade dos nutrientes visto que não houve nenhum aumento da ingestão. O facto de na 4ª semana não existirem diferenças significativas entre tratamentos nos pesos e nos IC das aves pode dever-se provavelmente ao facto de a sua capacidade digestiva aumentar à medida que estas crescem (Bedford, 2000) e por isso as enzimas exógenas são mais eficientes durante os primeiros 21 dias (Newman e Newman, 1988). Também o facto das médias do alimento total ingerido e IC total não serem significativamente diferentes deve-se talvez ao facto de a cevada ter uma boa qualidade e por isso a viscosidade provocada ser menor.

As dietas à base de cevada aumentam a viscosidade do *digesta*, que se deve ao facto de a cevada ter uma concentração elevada de β -glucanos (Choct, 2006). O aumento da viscosidade provoca um aumento no peso do tracto digestivo em relação ao peso vivo (Fuente *et al.*, 1998). Isto acontece porque a viscosidade diminui o transito intestinal o que provoca um aumento do volume do digesta e como consequência o peso e/ou o comprimento dos órgãos aumenta, o que pode constituir uma adaptação fisiológica para aumentar a ingestão alimentar e absorção de nutrientes, pois o aumento da viscosidade prejudica a digestão e a absorção nas aves (Choct, 2006). A inclusão da β -glucanase em dietas à base de cevada pode reduzir o peso do aparelho digestivo (Brenes *et al.*, 1993). Mas neste ensaio em qualquer um dos tratamentos não houve diferenças significativas entre tratamentos a nível dos pesos dos papos e dos fígados e o mesmo se verificou nos comprimentos do duodeno, jejuno, íleo e cecos.

No que diz respeito à viscosidade *in vitro* verifica-se que houve diminuição das viscosidades devido à suplementação enzimática em todos os tratamentos excepto no tratamento 33 H1 em comparação com o tratamento C-, e que o tratamento 100 H2 com o CBM teve o menor valor de viscosidade *in vitro*. Então podemos dizer que os resultados obtidos estão de acordo com os esperados pois o tratamento C- que não tinha suplementação enzimática obteve o maior valor de viscosidade e o tratamento 100 H2 que tem o CBM e a maior concentração enzimática teve o menor valor de viscosidade. O que vem provar o efeito das enzimas utilizadas na viscosidade, ou seja esta diminui, especialmente no tratamento 100 H2 com o CBM. Uma suplementação enzimática apropriada diminui a viscosidade intestinal e permite que a digestão ocorra completamente e rapidamente (Bedford, 2000). No ensaio, nas viscosidades do *digesta* no duodeno+jejuno e íleo não houve diferenças significativas em qualquer um dos tratamentos. O aumento da viscosidade tem um efeito negativo na ingestão alimentar (Campbell *et al.*, 1984), como não houve diferenças significativas nas viscosidades entre tratamentos este facto poderá explicar porque é que não houve diferenças significativas na ingestão alimentar na 1ª, 3ª e 4ª semana.

O CBM promove a actividade do módulo catalítico adjacente ao aumentar a concentração enzimática na superfície do substrato (Fernandes *et al.*, 1999 e Gilbert *et al.*, 2002), ou seja nos PNAs, levando a um aumento na performance dos animais (Taylor *et al.*, 2005 e Fontes *et al.*, 2004). Os tratamentos 33 H2 e 100 H2 que têm o CBM não demonstraram esse melhoramento neste trabalho. E ainda a contradizer isso verifica-se que o tratamento 100 H1 teve melhores resultados nos pesos e nos IC na 1ª, 2ª e 3ª semana comparativamente ao tratamento 100 H2 que tem o CBM. O facto do CBM além de mostrar preferência para as ligações mistas β -1,3-1,4 dos β -glucanos conseguir-se ligar-se a ligações β -1,4 da celulose (Carvalho *et al.*, 2004) pode provavelmente explicar porque é que os tratamentos com CBM não conseguiram demonstrar uma maior melhoria na performance das aves, ou seja, os CBM podem ter-se ligado às celulosas e não aos β -glucanos. Apesar de a hidrólise da celulose melhorar as performances dos frangos isto não se verificou porque o problema da viscosidade persistiu. Além disso o tratamento 100 H1 tem níveis de suplementação enzimática elevada o que leva a um aumento da actividade catalítica.

Na análise à actividade enzimática através das placas de petri verifica-se que em qualquer tratamento esta existe no papo. No tratamento 100 H2 a actividade enzimática existe em todos os outros órgãos mas em menor escala. O que nos indica que as enzimas exógenas em todos os tratamentos excepto no tratamento 100 H2 não conseguiram resistir às condições ácidas e proteolíticas presentes em alguns componentes do aparelho digestivo. Estes resultados são subjectivos e por isso a análise estatística não foi realizada, logo a actividade enzimática no tratamento 100 H2 pode não ser significativamente diferente

dos outros tratamentos e por isso neste tratamento não foram evidenciadas melhorias nas performances dos frangos.

Nos zimogramas verificou-se também que existia actividade enzimática no papo em todos os tratamentos suplementados e na moela nos tratamentos 100 H1 e 100 H2. O facto dos tratamentos 100 H1 e 100 H2 terem a sua actividade prolongada na moela pode-se dever ao facto de terem mais unidades de actividade enzimática (U) por quilo. O facto de a actividade enzimática no tratamento 100 H2 não corresponder à actividade enzimática feita pelo método das placas deve-se ao facto de que nos zimogramas só se utilizou um animal por tratamento e no método das placas utilizaram-se oito animais por tratamento. Em qualquer um dos zimogramas verifica-se que as enzimas estão propensas à divisão proteolítica, sendo menor no papo e depois completamente na moela nos tratamentos 33 H1 e 33 H2 e no duodeno nos tratamentos 100 H1 e 100 H2, e nos restantes órgãos. Tem havido alguma especulação sobre o principal local de acção das enzimas exógenas no aparelho digestivo das aves (Marquardt, 2001). Acredita-se que o principal local da hidrólise dos PNA solúveis pelas enzimas exógenas seja o intestino delgado. Assim a capacidade das enzimas exógenas resistirem ao pH e a proteólise tem sido uma grande preocupação (Fontes *et al.*, 2004). Mas o facto de o tratamento 100 H1 ter uma melhoria nos pesos e nos IC leva a ponderar que talvez o local onde as enzimas exógenas actuam poderá ser anterior ao intestino delgado.

As concentrações de β -glucano variam com a cultivar, as condições de crescimento, a origem geográfica, estado de maturação na colheita e as condições de armazenamento da cevada (Aastrup, 1979). Também o facto de a cevada estar armazenada durante muito tempo faz com que as suas enzimas endógenas que têm a capacidade de modificar a estrutura dos β -glucanos (Brufau *et al.*, 1993) tenham tempo o suficiente para aumentarem a qualidade da cevada, ou seja, diminuir a concentração dos β -glucanos. A diminuição dos β -glucanos leva à diminuição da viscosidade da cevada, levando a melhores performances. A resposta à suplementação enzimática é maior nos ingredientes de qualidade mais baixa (Bedford, 2000), ou seja, que têm uma maior concentração de β -glucanos. Então a cevada utilizada neste ensaio poderá ter uma boa qualidade, ou seja, tem uma concentração de β -glucanos baixa, pois não houve diferenças na viscosidade intestinal e nem na ingestão de alimento entre tratamentos na 1^a, 3^a e 4^a semana.

O facto de *in vivo* não termos obtidos os mesmos resultados que *in vitro*, ou seja onde a viscosidade do tratamento C- era a maior e a viscosidade do tratamento 100 H2 era a menor deve-se ao facto que em laboratório todos os parâmetros como o pH, a temperatura e o tempo de digestão estarem controlados e o mesmo não acontece nos animais onde o pH, a temperatura e o tempo de digestão estão dependentes de cada animal podendo haver diferenças significativas entre eles.

O facto de existir proteólise das enzimas faz com que estas não actuem como esperado e assim as performances não são as melhores.

Capítulo 6 – Conclusão

Neste trabalho os resultados obtidos não foram conclusivos no que diz respeito à suplementação enzimática melhorar as performances das aves.

Talvez em ensaios posteriores se deva analisar a qualidade da cevada para que esta tenha uma qualidade baixa, ou seja, que a sua concentração de β -glucanos seja alta e assim a resposta à suplementação enzimática seja maior.

Ambas as enzimas modulares H1 e H2 foram propensas à divisão proteolítica no aparelho digestivo das aves. Este processo apesar de não ter afectado a capacidade das enzimas resultantes da proteólise em hidrolizar os β -glucanos *in vitro* pode ter afectado a capacidade das enzimas actuarem *in vivo* especialmente a H2 que tem o CBM.

Para que seja possível analisar o efeito do CBM talvez se deva reduzir o nível da suplementação enzimática pois com os níveis deste trabalho os efeitos do CBM não se verificaram.

Capítulo 7 – Referências Bibliográficas

Aastrup, S., 1979, "The Effect of Rain on β -glucano Content in Barley Grains", Carlsberg Res. Commun., 44:381-393.

Albustany, Z., 1996, "The Effect of Pellenting and Enzyme-Supplemented Barley-Based Broiler Diet", Animal Feed Science and Technology, 58: 283-288.

Annison, G., Choct, M., 1991, "Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects", World's Poult. Sci. J. 47:232– 242.

Bach Knudsen, K.E., 1997, "Carbohydrate and Lignin Contents of Plant Materials Used in Animal Feeding", Animal Feed Science and Technology, 67: 319-338.

Bedford, M.R., 1993, "Mode of Action of Feed Enzymes", J. Applied Poultry Res., 2: 85-92.

Bedford, M.R., 2000, "Exogenous Enzymes in Monogastric Nutrition – Their Current Value and Future Benefits", Animal Feed Science and Technology, 86: 1-13.

Bedford, M.R., Apajalahti, J., 2001, "Microbial Interactions in Response to Endogenous Enzyme Utilization, in: Bedford, M.R., Partridge, G.G., (Eds) Enzyme in Farm Animal Nutrition, pp. 299-314, CABI Publishing, Wallingford.

Bedford, M.R., Morgan, A.J., 1996, "The Use of Enzymes in Poultry Diets", World's Poultry Science Journal, Vol. 52, March.

Boraston, A.B., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Davies, G.J., 2004, Biochem. Journal, 382: 769-781.

Brenes, B., Smith, M., Guenter, W., Marquardt, R.R., 1993, "Effect of Enzyme Supplementation on the Performance and Digestive Tract Size of Broiler Chickens Fed Wheat and Barley Base Diets", Poultry Science, 72:1731-1739.

Brufau, J., Francesch, M., Pérez-Vendrell, A.M., Esteve-García, E., 1993, "Effects of Post-Harvest Storage on Nutritive Value of Barley in Broilers", Pages 125-128 in: Proceedings of the 1st Symposium of Enzymes in Animal Nutrition, Kartause Ittingen, Switzerland.

Campbell, G.L., Classen, H.L., Salmon, R.E., 1984, "Enzyme Supplementation of Barley Diets for Broilers", *Feedstuffs* (Minneapolis), 59: 26-27.

Campos, L.S., 1999, "Entender a Bioquímica – O metabolismo fundamental em animais e plantas", Segunda Edição, Escolar Editora.

Carré, B., Derouet, L., Leclercq, B., 1990, "The Digestibility of Cell-Wall Polysaccharides from Wheat (Bran or Whole Grain), Soybean Meal, and White Lupin Meal in Cockerels, Muscovy Ducks, and Rats", *Poultry Science*, 69: 623-633.

Carvalho, A.L., Goyal, A., Prates, J.A.M., Bolam, D.N., Gilbert, H.J., Pires, V.M.R., Ferreira, L.M.A., Planas, A., Romão, M.J., Fontes, C.M.G.A., 2004, "The Family 11 Carbohydrate-binding Module of *Clostridium Thermocellum* Lic26A-Cel5E Accommodates β -1,3-1,4-Mixed Linked Glucans at a Single Binding Site", *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 34785-34793.

Cheeke, P.R., 1991, "Applied Animal Nutrition – Feeds and Feeding", Macmillan Publishing Company.

Chesson, A., 1991, "Effects of Supplementary Enzymes in Barley Diets", *Options Méditerranéennes, Série Séminaires*, 20: 55-62.

Choct, M., 2006, "Enzymes for the Feed Industry: Past, Present and Future", *World's Poultry Science Journal*, Vol. 62, March.

Classen, H.L., Campbell, G.L., Grootwassink, J.W.D., 1988, "Improved Feeding Value of Saskatchewan-grown Barley for Chickens with Dietary Enzyme Supplementation", *Can. Journal of Animal Science*, 68: 1253-1259.

Cole, D.J.A., Haresign, W., 1989, "Recent Developments in Poultry Nutrition", Butterworths.

Coutinho, P.M., Henrissat, B., 2003, Subject: Cazy-Carbohydrate-Active Enzyme, <http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY>.

Elwinger, K.J., Saterby, B., 1987, "The Use of β -glucanase in Practical Broiler Diets Containing Barley or Oats – Effect of Enzyme Level Type and Quality of Grain", *Swed. J. Agri. Res.*, 17: 133-140.

Etches, R.J., 1998, "A Holistic View of Poultry Science from a Reductionist Perspective", *British Poultry Science*, 39: 5-10.

Fernandes, A.C.G., Fontes, C.M.G.A., Gilbert, H.J., Hazelwood, G.P., Fernandes, T.H., Ferreira, L.M.A., 1999, "Homologous Xylanases from *Clostridium Thermocellum*: Evidence for Bi-Functional Activity, Synergism Between Xylanases Catalytic Modules and the Presence of Xylan-binding Domains in Enzyme Complexes", *Biochemical Journal*, 342: 105-110.

Fontes, C.M.G.A., Ponte, P.I.P., Reis, T.C., Soares, M.C., Gama, L.T., Dias, F.M.V., Ferreira, L.M.A., 2004, "A Family 6 Carbohydrate-Binding Module Potentiates the Efficiency of a Recombinant Xylanase Used to Supplement Cereal-based Diets of Poultry", *British Poultry Science*, 45: 648-656.

Fuente, J.M., Perez de Ayala, P., Flores, A., Villamide, M.J., 1998, "Effect of Storage Time and Dietary enzyme on the Metabolizable Energy and Digesta Viscosity of Barley-Based Diets for Poultry", *Poultry Science*, 77: 90-97.

Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Szabo, L., Xie, H., Williamson, M.P., Simpson, P.J., Jamal, S., Boraston, A.B., Kilburn, D.G., Warren, R.A.J., 2002, "An Update on Carbohydrate Binding Modules, in: *Carbohydrate Bioengineering*", London, Royal Society of Chemistry.

Hesselman, K., Åman, P., 1986, "Effect of β -glucanase on the Utilization of Starch and Nitrogen by Broiler Chickens fed Barley of Low- or High-Viscosity", *Animal Feed Science Technology*, 7: 351-358.

Hesselman, K., Elwinger, K., Thomke, S., 1982, "Influence of Increasing Levels of β -glucanase on the Productive Value of Barley Diets for Broiler Chickens", *Animal Feed Science Technology*, 7: 351-358.

Hübner, K., Vahjen, W., Simon, O., 2002, "Bacterial Responses to Different Dietary Cereal Type and Xylanase Supplementation in the Intestine of Broiler Chicken", *Archive of Animal Nutrition*, 56: 167-187.

Jamroz, D., Jakobsen, K., Bach Knudsen, K.E., Wilczkiewicz, A., Orda, J., 2002, "Digestibility and Energy Value of the Non-Starch Polysaccharides in Young Chickens, Ducks and Geese, Fed Diets Containing High Amounts Of Barley", *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131: 657-668.

Jeroch, H., Dänicke, S., 1996, "Barley in Poultry Feeding: A Review", *World's Poultry Science Journal*, 51: 271-291.

Johnson, I.T., Gee, J.M., 1981, "Effect of Gel-Forming Gums on the Intestinal Unstirred Layer and Sugar Transport", *In Vitro Gut*, 22: 398-403.

Józefiak, D., Rutkowski, A., Jensen, B.B., Engberg, R.M., 2006, "The effect of β -glucanase Supplementation of Barley- and Oat-Based Diets on Growth Performance and Fermentation in Broiler Chicken Gastrointestinal Tract", *British Poultry Science*, 47: 57-64.

Marquardt, R.R., Bedford, M.R., 2001, "Future Horizons, in: *Enzymes in Farm Animal Nutrition*", UK, CABI Publishing.

McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., 2002, "Animal Nutrition", Sixth Edition, Prentice Hall.

Murison, S., Mulder, M., Hotten, P.M., 1989, "Enzymatic Solubilisation of Aleurone Cell Walls and Release Protein", Page 197 in *Proceedings of the Fifth Cell Wall Meeting* (Fry, S.C., Brett, C.T., Reid, J.S.G., eds.). University of Edinburgh, U.K.

Nahas, J., Lefrançois, M.R., 2001, "Effect of Feeding Locally Grown Whole Barley or Without Enzyme Addition and Whole Wheat on Broiler Performance and Carcass Traits", *Poultry Science*, 80: 195-202.

Najmudin, S., Guerreiro, C.I.P.D., Carvalho, A.L., Prates, J.A.M., Correia, M.A.S., Alves, V.D., Ferreira, L.M.A., Romão, M.J., Gilbert, H.J., Bolam, D.N., Fontes, C.M.G.A., 2006, "Xyloglucan is Recognized by Carbohydrate-binding Modules that Interact with β -Glucan Chains", *Journal of Biological Chemistry*, vol.281, nº 13: 8815-8828.

Newman, K.R., Newman, C.W., 1988, "Nutritive Value of New Hull-Less Barley Cultivar in Broiler Chick Diets", *Poultry Science*, 67: 1573-1579.

North, M.O., Bell, D.D., 1990, "Commercial Chicken Production Manual", Fourth Edition, An AVI Book, Published by Van Nostrand.

Parkhurst, C.R., Mountney, G.J., 1988, "Poultry Meat and Egg Production", An AVI Book, Published by Van Nostrand Reinhold Company.

Pettersson, D., Graham, H., Åman, P., 1991, "The Nutritive Value for Broiler Chickens of Pelleting and Enzyme Supplementation of a Diet Containing Barley, Wheat and Rye", *Animal Feed Science Technology*, 33: 1-14.

Randall, D., Burggren, W., French, K., 2000, "Eckert – Fisiologia Animal – Mecanismos e Adaptações", Quarta Edição, Editora Guanabara Koogan S.A.

Ross, 2007, "Broiler Performance Objectives", Aviagen.

Ross, 2008, "Ross – Broiler Management Manual", Aviagen

Rosnagel, B.G., Harvey, B.L., Bhatti, 1983, "Scout Hulless Barley", *Can. Journal of Plant Science*, 63: 751-752.

Rotter, B.A., Marquardt, R.R., Guenter, W., 1989, "Enzymes in Feed – They Really Can Be Made To Work", *The Feed Compounder*, 9: 32-36.

Scott, T.A., Silversides, F.G., Classen, H.L., Swift, M.L., Bedford, M.R., Hall, J.W., 1998a, "A Broiler Chick Bioassay for Measuring the Feeding Value of Wheat and Barley in Complete Diets", *Poultry Science*, 77: 449-455.

Sibbald, I.R., 1982, "Measurement of Bioavailable Energy in Poultry Feeding Stuffs: A Review", *Can. Journal of Animal Science*, 62: 983-1048.

Silva, S.S.P., Smithard, R.R., 2002, "Effect of Enzyme Supplementation of a Rye-Based Diet on Xylanase Activity in the Small Intestine of Broilers, on Intestinal Crypt Proliferation and Nutrient Digestibility and Growth Performance of the Birds", *British Poultry Science*, 43: 274-282.

Steenfeldt, S., 2001, "The Dietary Effect of Different Wheat Cultivars for Broiler Chickens", *British Poultry Science*, 42: 595-609.

Svihus, B., Herstad, O., Newman, C.W., 1997a, "Effect of High-moisture Storage of Barley, Oats, and Wheat on Chemical Content and Nutritional Value for Broiler Chickens", *Acta Agric. Scand. Sect. A. Animal Science*, 47:39-47.

Svihus, B., Herstad, O., Newman, C.W., Newman, R.K., 1997b, "Comparison of Performance and Intestinal Characteristics of Broiler Chickens Fed on Diets Containing Whole, Rolled or Ground Barley", *British Poultry Science*, 38: 524-529.

Taylor, E.J., Goyal, A., Guerreiro, C.I.P., Prates, J.A.M., Money, V.A., Ferry, N., Morland, C., Planas, A., Macdonald, J.A., Stick, R.V., Gilbert, H.J., Fontes, C.M.G.A., Davies, G.J., 2005, "How Family 26 Glycoside Hydrolases Orchestrate Catalysis on Different Polysaccharides – Structure and Activity of a *Clostridium Thermocellum* Lichenase, CtLic26A", *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 32761-32767.

Yasar, S., Forbes, J.M., 1999, "Performance and Gastrointestinal Response of Broiler Chickens Fed on Cereal Grain-Based Foods Soaked in Water", *British Poultry Science*, 40: 65-76.

Anexo 1

Quadro 12 – Performances esperadas dos Ross 308 (Machos). (Ross, 2007)

Male Performance

Day	Bodyweight (g)	Daily gain (g)	Av. daily gain/week (g)	Daily intake (g)	Cum. intake (g)	FCR
0	42					
1	56	14				
2	71	15				
3	89	18				
4	109	20				
5	131	22				
6	156	25				
7	184	28	20.29		162	0.880
8	215	31		39	201	0.935
9	250	35		44	245	0.980
10	287	37		49	294	1.024
11	328	41		54	348	1.061
12	372	44		60	408	1.097
13	420	48		64	472	1.124
14	471	51	41.00	70	542	1.151
15	525	54		77	619	1.179
16	583	58		82	701	1.202
17	644	61		88	789	1.225
18	708	64		94	883	1.247
19	776	68		100	983	1.267
20	846	70		107	1090	1.288
21	920	74	64.14	113	1203	1.308
22	996	76		120	1323	1.328
23	1075	79		126	1449	1.348
24	1157	82		132	1581	1.366
25	1241	84		138	1719	1.385
26	1327	86		144	1863	1.404
27	1415	88		150	2013	1.423
28	1505	90	83.57	157	2170	1.442
29	1597	92		162	2332	1.460
30	1690	93		167	2499	1.479
31	1785	95		173	2672	1.497
32	1880	95		179	2851	1.516
33	1977	97		183	3034	1.535
34	2075	98		188	3222	1.553
35	2173	98	95.43	193	3415	1.572

Male Performance continued

Day	Bodyweight (g)	Daily gain (g)	Av. daily gain/week (g)	Daily intake (g)	Cum. intake (g)	FCR
36	2272	99		197	3612	1.590
37	2371	99		202	3814	1.609
38	2470	99		205	4019	1.627
39	2570	100		209	4228	1.645
40	2669	99		213	4441	1.664
41	2768	99		216	4657	1.682
42	2867	99	99.14	219	4876	1.701
43	2966	99		222	5098	1.719
44	3064	98		225	5323	1.737
45	3161	97		227	5550	1.756
46	3258	97		229	5779	1.774
47	3353	95		232	6011	1.793
48	3448	95		233	6244	1.811
49	3541	93	96.29	235	6479	1.830
50	3634	93		236	6715	1.848
51	3725	91		237	6952	1.866
52	3815	90		238	7190	1.885
53	3904	89		240	7430	1.903
54	3991	87		240	7670	1.922
55	4077	86		240	7910	1.940
56	4162	85	88.71	241	8151	1.958
57	4245	83		241	8392	1.977
58	4327	82		241	8633	1.995
59	4407	80		242	8875	2.014
60	4485	78		241	9116	2.033
61	4562	77		241	9357	2.051
62	4638	76		240	9597	2.069
63	4712	74	78.57	240	9837	2.088
64	4784	72		240	10077	2.106
65	4855	71		239	10316	2.125
66	4925	70		238	10554	2.143
67	4992	67		237	10791	2.162
68	5058	66		237	11028	2.180
69	5123	65		235	11263	2.199
70	5186	63	67.71	235	11498	2.217

NOTE

In the table values are rounded, this may result in small inaccuracies when using the objectives to calculate other performance statistics.